

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/543</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/58976</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)</p>		
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02808</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 1999 (26.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  198 21 257.7      12. Mai 1998 (12.05.98)      DE  198 41 569.9      11. September 1998 (11.09.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): VIRO-FEM DIAGNOSTIKA GMBH [DE/DE]; Esterau-Strasse 1, D-56379 Holzappel (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILFRICH, Ralf [DE/DE]; Friedhofstrasse 22, D-65597 Hünfelden-Heringen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: MÜLLER, Eckhard; Eifelstrasse 14, D-65597 Hünfelden-Dauborn (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02808</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 1999 (26.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  198 21 257.7      12. Mai 1998 (12.05.98)      DE  198 41 569.9      11. September 1998 (11.09.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): VIRO-FEM DIAGNOSTIKA GMBH [DE/DE]; Esterau-Strasse 1, D-56379 Holzappel (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILFRICH, Ralf [DE/DE]; Friedhofstrasse 22, D-65597 Hünfelden-Heringen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: MÜLLER, Eckhard; Eifelstrasse 14, D-65597 Hünfelden-Dauborn (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02808</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 1999 (26.04.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  198 21 257.7      12. Mai 1998 (12.05.98)      DE  198 41 569.9      11. September 1998 (11.09.98)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): VIRO-FEM DIAGNOSTIKA GMBH [DE/DE]; Esterau-Strasse 1, D-56379 Holzappel (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILFRICH, Ralf [DE/DE]; Friedhofstrasse 22, D-65597 Hünfelden-Heringen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: MÜLLER, Eckhard; Eifelstrasse 14, D-65597 Hünfelden-Dauborn (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>			

(54) Title: INDICATOR STRIP FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES IN BLOOD SERUM

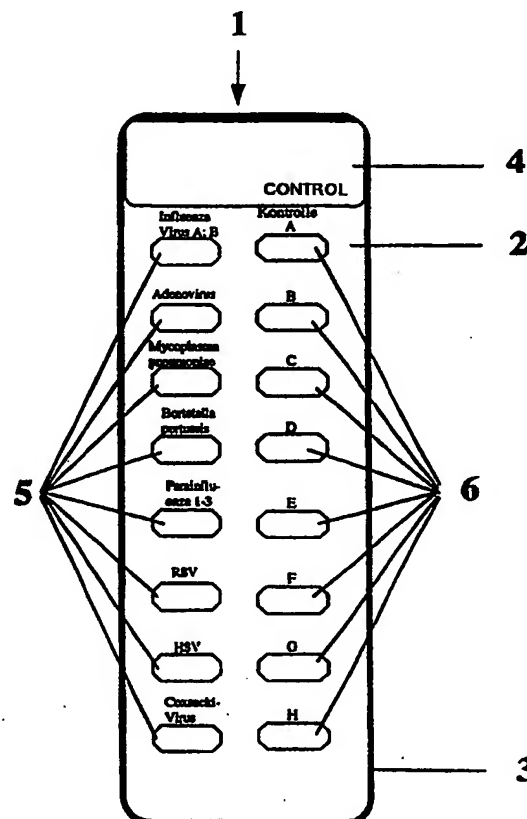
(54) Bezeichnung: INDIKATIONSSTREIFEN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN IM BLUTSERUM

(57) Abstract

The invention relates to an indicator strip (1) for the detection of antibodies in the blood serum of patients, comprising one or several fields (5) in which antigens for one or several diseases are fixed. When patient serum is added, the corresponding antigen clings to the antigen corresponding to a disease, whereupon said antigens are made visible in the form of a coloured stain in a subsequent reaction. Other fields (6), where human antibodies are fixed according to various concentrations, are provided in order to determine not only the quality but also the quantity of said antibodies. It is thus possible to estimate the concentration of antibodies in the serum by evaluating the colour stains produced.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Indikationsstreifen (1) zum Nachweis von Antikörpern im Blutserum von Patienten mit einem oder mehreren Feldern (5), in denen Antigene für eine oder mehrere Krankheiten fixiert sind, wobei das entsprechende Antigen beim Hinzufügen von Patientenserum die der Krankheit entsprechenden Antikörper festhält und diese Antikörper durch eine nachfolgende Reaktion als Farbfleck sichtbar gemacht werden. Um die Antikörper nicht nur qualitativ festzustellen, sondern auch eine Aussage über deren Menge machen zu können, sind erfindungsgemäß weitere Felder (6) vorgesehen, in denen humane Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen fixiert sind. Die Auswertung der entstehenden Farbflecken erlaubt eine Abschätzung der Antikörperkonzentration im Serum.



BEST AVAILABLE COPY

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Bezeichnung:** INDIKATIONSSTREIFEN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN IM BLUTSERUM

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft einen Indikationsstreifen zum Nachweis von Antikörpern im Blutserum von Patienten mit einem oder mehreren Feldern, in denen Antigene für eine oder mehrere Krankheiten fixiert sind, wobei das entsprechende Antigen beim Hinzufügen von Patientenserum die der Krankheit entsprechenden Antikörper festhält und diese Antikörper durch eine nachfolgende Reaktion als Farbfleck sichtbar gemacht werden.

Ein solcher Indikationsstreifen für einen auch Enzymimmunoassay genannten Test auf Antikörper im Blut ist bereits aus der DE 3346795 A1 bekannt und bildet den Oberbegriff des Anspruchs 1. Der dort beschriebene Test dient zum serologischen Nachweis von durch Viren, Bakterien oder dgl. Erreger hervorgerufenen Krankheiten, wie bspw. Infektionen. Der Test nutzt die Tatsache, daß beim Vorliegen einer Krankheit der Körper in seinem (Blut)-Serum Antikörper bildet, die genau dem Erreger-Antigen entsprechen (an ihm andocken und es unschädlich machen). Kann man also solche krankheitsspezifischen Antikörper im Blutserum nachweisen, ist damit der indirekte Beweis geführt, daß der Patient genau diese Krankheit hat oder hatte. Dieser Test zählt wegen seines Wirkmechanismus zu den sogenannten indirekten Meßverfahren, da er nicht die Erreger (Antigene) an sich nachweist, sondern die vom Körper auf die Erreger hin gebildeten spezifischen Antikörper.

Zur Herstellung dieses bekannten Teststreifens werden zunächst Antigene, also bestimmte krankheitsverursachende Proteine, verschiedener Krankheiten auf die Festphasen mehrerer Testfelder, insbesondere auf eine Nitrocellulose- oder Polyamidfolie, aufgetragen und fixiert. Danach werden die von den Antigenen nicht besetzten Adsorptionsstellen der Folie

abgesättigt. Zum Durchführen des Tests wird Patientenserum aufgeträufelt. Hierdurch gehen die im Patientenserum enthaltenen erregerspezifischen Antikörper, sofern vorhanden, mit dem der Krankheit entsprechenden deponierten Antigen eine spezifische Bindung ein, nämlich eine Antigen-Antikörper-Reaktion, Ag-Ak- oder Immunreaktion. Die auf das Antigen reagierenden Antikörper werden sodann durch eine nachfolgende Reaktion sichtbar gemacht, wie zum Beispiel durch eine Behandlung mit einem spezifischen Enzymkonjugat und die nachfolgende Zugabe eines Substrats für das im Konjugat enthaltene Enzym und einen Farbstoffprecursor. Dadurch wird auf der Folie ein gut haftender und deutlich sichtbarer Farbkreis (blot, nach der Immunreaktion: Immunoblot) gebildet. Als Hilfsschritt wird nach jedem zuvor genannten Behandlungsschritt überschüssiges Reagenz durch Waschen entfernt. Zum Schluß wird eine visuelle Bewertung der Dunkelfärbung auf der Folie vorgenommen. Das der gegebenen oder vorliegenden Krankheit entsprechende Feld ist verfärbt, die anderen nicht.

Das beschriebene Verfahren und der dabei eingesetzte Meßstreifen ermöglichen also einen qualitativen, aber keinen quantitativen Nachweis von erregerspezifischen Antikörpern (und damit Krankheiten) in einem Serum. Wünschenswert wäre nicht nur die Kenntnis, ob eine Krankheit vorliegt oder vorlag, sondern das Wissen, wieviele Antikörper vorliegen, also die Kenntnis um die Intensität oder Aktualität der Krankheit.

Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, einen Indikationsstreifen anzugeben, welcher auch eine Aussage über die Quantität von im Blut vorhandenen Antikörpern erlaubt.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist der erfindungsgemäße Indikationsstreifen dadurch gekennzeichnet, daß weitere Felder, in denen humane Referenz-Antikörper in

unterschiedlichen Konzentrationen fixiert sind, vorgesehen sind. Diese Felder verfärben sich bei der der Immunreaktion nachfolgenden, an sich bekannten (Enzym-) Reaktion entsprechend der Anzahl der Antikörper und erlauben so durch Farbvergleich (Helligkeitsvergleich) mit dem Antigenfeld neben einer Aussage, welche Krankheit vorliegt, eine Aussage über die Menge der Antikörper im Serum, also über die Stärke und Aktualität der Krankheit.

Die Erfindung macht von der überraschend gefundenen Tatsache Gebrauch, daß die Einfärbungsreaktion sowohl die aus der zu untersuchenden Flüssigkeit auf die Festphase fixierten körpereigenen Antikörper, als auch die auf die Festphase aufgebrauchten Referenz-Antikörper gleichermaßen markiert. Die Enzym-Substrat-Farbreaktion ruft eine Dunkelfärbung sowohl bei den körpereigenen Antikörpern als auch bei den Referenz-Antikörpern hervor. Da die Referenz-Antikörper aber in unterschiedlichen Konzentrationen auf der Festphase des Teststreifens aufgetragen sind und die Enzym-Substrat-Farbreaktion einen für die jeweilige Konzentration des Referenz-Antikörpers charakteristischen Farbstoff bildet, ist eine Farbvergleichsskala und damit ein Vergleichsstandard für die Konzentration der Antikörper auf der Festphase erzeugt. Ein visueller Farbenabgleich zwischen diesem Vergleichsstandard und der jeweiligen Dunkelfärbung der körpereigenen Antikörper ermöglicht eine direkte Aussage über die Quantität der Antikörper, da bei Farbgleichheit die Quantität durch Ablesen der Konzentration der deponierten Referenz-Antikörper angegeben werden kann. Im Falle, daß die Farbintensität der körpereigenen Antikörper zwischen zwei Farbintensitäten der Konzentrationen von deponierten Referenz-Antikörpern liegt, ist die Quantität der körpereigenen Antikörper als Zwischenwert zwischen den beiden Konzentrationen ablesbar. Damit ist eine Überprüfung der Immunität, d.h. der erworbenen Unempfindlichkeit für Krankheitserreger, und eine Aussage über den Zustand oder die

Stärke der zugrundeliegenden Krankheiten, wie bspw. Infektionskrankheiten, Auto-Immun-Krankheiten, z.B. Rheuma, Allergien, Tumoren und dgl. ermöglicht.

Die Erfindung ermöglicht auch bspw. die Dynamik eines Krankheitsverlaufes besser zu verfolgen, da durch die erfindungsgemäße Bestimmung der Antikörperkonzentration, die Wirksamkeit eines Medikaments und/oder einer Medikamentendosis gegen einen bestimmten Erreger nach der Inkubationszeit quantitativ überprüfbar ist. Mit der Erfindung ist ein Meßinstrument zum quantitativen Nachweis von Antikörpern in einer Flüssigkeit geschaffen, welches direkt ablesbar und an jedem Ort und zu jeder Zeit universell einsetzbar sowie kostengünstig herstellbar ist.

Zur Durchführung der Erfindung werden (bei einem Streifen zum Nachweis nur einer Krankheit) das oder (bei einem Streifen zum Nachweis mehrerer Krankheiten) die spezifischen Antigene bevorzugt auf eine Festphase aufgebracht. Hierdurch ist die Bindung der Antikörper an die Festphase gewährleistet. Zum gleichzeitigen Überprüfen von verschiedenen Krankheiten, bspw. verschiedenen Infektionen können auch mehrere verschiedene Antigene auf die Festphase aufgebracht sein.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung besteht darin, daß die Referenz-Antikörper mit gleicher subtypisch spezifischer Klasse, wie bspw. IgG, IgA, IgM oder dgl., aufgetragen werden. Hierdurch ist die Quantifizierung des Tests für die Überprüfung einer bestimmten Krankheit erreicht, das Auftragen einer bestimmten subtypisch spezifischen Klasse für die Referenz-Antikörper das notwendige aussagekräftige Kriterium für den Nachweis der Krankheit liefert. Die Verwendung von verschiedenen subtypisch spezifischen Referenz-Antikörpern beim Vergleichsstandard ermöglicht auch die Bestimmung der in der Körperflüssigkeit vorhandenen subtypisch spezifischen Antikörperklassen.

Nach einer anderen Ausgestaltung der Erfindung wird zum Nachweis der Antikörper und der Referenz-Antikörper die Festphase mit einem Enzymkonjugat, wie bspw. einem subtypisch spezifischen Immunoglobulin Typ G, Typ A oder Typ M (IgG, IgA, IgM) oder dgl., behandelt. Hierdurch ist gewährleistet, daß nur solche Antikörper und Referenz-Antikörper markiert werden, welche im Vergleich zum verwendeten Enzymkonjugat die gleiche subtypisch spezifische Klasse besitzen. Für die Bestimmung der vorhandenen Antikörperklassen in der zu untersuchenden Flüssigkeit wird der Referenz-Antikörper und das Enzymkonjugat in gleicher subtypisch spezifischer Klasse verwendet.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung besteht darin, daß als Substrat ein Enzymsubstrat, vorzugsweise auf Tetramethylbenzidin-Basis, für eine Niederschlagsfärbung verwendet wird. Hierdurch wird ein gut haftender und stabiler Farbstoff mit hoher Sensitivität auf der Festphase gebildet, und zwar sowohl an den Stellen an denen die markierten Antikörper als auch die markierten Referenz-Antikörper lokalisiert sind.

Als Antigene können sowohl organische, insbesondere Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Nukleinsäuren oder dgl., als auch anorganische Substanzen eingesetzt sein. Hierdurch ist erreicht, daß sowohl durch artfremde organische als auch durch anorganische Substanzen im Körper hervorgerufene Antikörper an die Festphase gebunden werden, so daß bspw. die Immunität für Chemikalien und der Verlauf bspw. einer Blutvergiftung durch chemische Giftstoffe mittels des erfindungsgemäßen Indikationsstreifens quantitativ überprüfbar sind.

Nach einem anderen vorteilhaften Gedanken der Erfindung kommen Tracer als fluoreszierende oder radioaktiv markierende Substanzen zum Einsatz. Hierdurch ist insbesondere eine zahlenmäßige quantitative Auswertung der mit dem Teststreifen

gemessenen Antikörperkonzentrationen in einem speziell hierfür eingerichteten Laboratorium ermöglicht, wobei Spektrophotometer, Elektrophorese-Geräte und/oder radiometrische Vorrichtungen bei der Auswertung zum Einsatz kommen.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Indikationsstreifens besteht darin, daß die Festphase als Adsorptionsfolie ausgebildet ist. Hierdurch ist die Anlagerung des Antigens und des Referenz-Antikörpers an die Oberfläche der Adsorptionsfolie erreicht. Diese Anlagerungen sind so haltbar, daß eine Lagerung des erfindungsgemäßen Meßstreifens bei einer Umgebungstemperatur von vorzugsweise 4° C über mehrere Monate möglich ist.

Nach einem weiteren vorteilhaften Merkmal der Erfindung sind den Reaktionsfeldern und/oder den Referenzfeldern Datenfelder, wie bspw. Namen des zu untersuchenden Krankheitserregers, Kontrollzeichen, Symbole und dgl. zugeordnet, zum Beispiel aufgedruckt. Hierdurch ist bei der Auswertung des Meßstreifens der direkte Nachweis einer der zu untersuchenden Krankheiten ermöglicht, wobei dann das zugehörige Reaktionsfeld eine Färbung aufweist. Da die Referenzfelder bspw. mit einem Kontrollzeichen beschriftet werden, um eine Rekonstruktion der auf die Referenzfelder aufgetragenen unterschiedlichen Konzentrationen des Referenz-Antikörpers sicherzustellen, ist bei der Auswertung auch eine direkte Aussage über die Schwere der Krankheit ermöglicht. Hierfür sind die durch die Enzym-Substrat-Farbreaktion auf den Reaktionsfeldern und Referenzfeldern hervorgerufenen Dunkelfärbungen miteinander zu vergleichen.

Zwei Ausführungen von erfindungsgemäßen Indikationsstreifen für einen Enzymimmunoassay werden nachfolgend anhand der in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiele zum Nachweis von mehreren verschiedenen Krankheitserregern näher



beschrieben. Dabei bilden alle beschriebenen und/oder bildlich dargestellten Merkmale für sich oder in beliebiger Kombination den Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Es zeigen:

Figuren 1 und 2 mögliche Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen Meßstreifens zum Nachweis von Antikörpern.

Der erfindungsgemäße Meßstreifen 1 gemäß Fig. 1 enthält ein handelsübliches Nitrocellulose-Folienmaterial 2 mit einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$ . Auf diese Nitrocellulose-Folie 2 sind in der Größe des Meßstreifens 1 eine äußere Umrandungslinie 3 und ein Kennzeichnungsfeld 4 sowie in einer linken und rechten Spalte mehrere untereinander angeordnete Antigenfelder 5 und Antikörperfelder 6 aufgedruckt. Ferner wird jeweils oberhalb der in Zeilen angeordneten linken Antigenfelder 5 der Name des zu untersuchenden Krankheitserregers und oberhalb der rechten Antikörperfelder 6 jeweils ein Kontrollzeichen, bspw. die Buchstaben A bis H, für die unterschiedlichen Konzentrationen abgedruckt. Bei dem hier gewählten Ausführungsbeispiel der zu untersuchenden acht respiratorischen Krankheitserreger sind dies auf der linken Spalte Influenzavirus A und B, Adenovirus, Mycoplasma pneumoniae, Bordetella pertussis, Parainfluenzavirus 1 bis 3, RSV, HSV und Coxsacki-Virus.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Indikatorstreifens erfolgt zum Beispiel derart, daß die Nitrocellulose-Folie 2 in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) angefeuchtet wird. Ferner werden für die zu untersuchenden Krankheitserreger in einer bekannten Art und Weise Proteinantigenlösungen mit einer Konzentration von  $5\text{-}15\ \text{ng}/\mu\text{l}$  aus käuflich erworbenen Proteinantigenen hergestellt.

Nachfolgend wird die Nitrocellulose-Folie 2 in eine herkömmliche Dot-Blot-Apparatur, zum Beispiel einem "SlotBlotter" der Firma Hofer, eingespannt.

Anschließend werden jeweils 150  $\mu$ l der verdünnten Proteinantigenlösungen (entspricht ca. 500 ng bis 1,5  $\mu$ g Protein) auf die in der linken Spalte der Nitrocellulose-Folie 2 zugehörigen Antigenfelder 5 aufgetragen. Danach werden Lösungen mit humanen Antikörpern mit kontinuierlich steigender Konzentration auf die Antikörperfelder 6 der rechten Spalte der Nitrocellulosefolie 2 aufgebracht.

Nach einer Einwirkungszeit für die Adsorption der Protein- und Human-Antikörperlösungen wird die Nitrocellulose-Folie 2 in einem PBS-Puffer gewaschen.

Im folgenden wird die Nitrocellulose-Folie mit einer Milchpulverlösung behandelt, um nicht besetzte Adsorptionsstellen der Folie abzusättigen.

Hiernach wird die Nitrocellulose-Folie 2 dreimal nacheinander mit einem PBS-Puffer gewaschen und anschließend unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

Schließlich werden die erfindungsgemäßen Meßstreifen 1 außerhalb der Umrandungslinie 3 ausgestanzt. Der so hergestellte Meßstreifen 1 wird zusammen mit einem Trockenmittel in Folie eingeschweißt und für eine spätere Verwendung bei 4° C gelagert.

Die Verwendung des Meßstreifen 1 durch den Arzt oder ein Labor erfolgt zum Beispiel dergestalt, daß zunächst der Meßstreifen 1 zur Regeneration mit der bereits oben erwähnten Milchpulverlösung behandelt wird. Danach werden die zu untersuchenden Patientenserum nach einem bereits bekannten Verfahren in Milchpulverlösung verdünnt und auf den

Meßstreifen 1 aufgetragen. Hierdurch werden Immunreaktionen hervorgerufen, indem die im Serum enthaltenen erregerspezifischen Antikörper mit den auf der linken Spalte in den Antigenfeldern 5 deponierten Antigenen eine spezifische Bindung eingehen.

Anschließend werden die nicht gebundenen Serenbestandteile abgesaugt, und der Meßstreifen 1 wird dreimal mit einem bekannten PBS-Tween-Detergens gewaschen.

Daraufhin erfolgt eine Inkubation mit einem anti-human Immunglobulin-Enzymkonjugat beliebiger Klasse, wodurch die erregerspezifischen Antikörper markiert werden. Durch die Zugabe dieses Enzymkonjugats werden auch die auf der rechten Spalte des Meßstreifen 1 aufgetragenen unterschiedlichen humanen Antikörperkonzentrationen markiert.

Es folgt ein weiterer Waschschrift mit dem PBS-Tween-Detergens, wobei dieser dreimal gewechselt wird. Zur Entfernung des Detergens wird die Folie ein weiteres mal mit aqua dest. gewaschen.

Eine Färbung erfolgt mit 1 ml pro Folie eines käuflich erworbenen Substrates auf Tetramethylbenzidin-Basis der Firma Kirke-Gaard und Perry mit Produktcode 50-77-02.

Die Färbung wird durch intensives Waschen des Meßstreifens 1 mit destilliertem Wasser beendet.

Am Ausführungsbeispiel der acht respiratorischen Krankheitserreger betrachtet, zeigen die auf der linken Spalte des Meßstreifens 1 angeordneten Antigenfelder 5 unterschiedliche Farbflecken, deren Farbtensitäten von der jeweiligen Quantität der im Serum enthaltenen erregerspezifischen Antikörper abhängen. Die in der rechten Spalte des Meßstreifens 1 angeordneten Antikörperfelder 6

zeigen Farbflecken mit kontinuierlich ansteigenden Farbintensitäten, was durch die unterschiedlichen Konzentrationen der aufgebrauchten humanen Antikörper bedingt ist.

Aus einem visuellen Farbenabgleich zwischen den Farbintensitäten der Felder 5 auf der linken und der Felder 6 auf der rechten Spalte des Meßstreifens 1 läßt sich eine Aussage über die Quantität von Antikörpern im Patientenserum und damit über den Zustand der Krankheit erzielen. Bei Farbgleichheit einer bzw. mehrerer der linken Antigenfelder 5, bspw. das mit der Bezeichnung "Adenovirus", mit einem der rechten Antikörperfelder 6, bspw. mit demjenigen mit Kontrollzeichen F, entspricht auch die Konzentration der im Patientenserum enthaltenen Antikörper des Adenovirus dem Wert der Konzentration des Antikörperfeldes 6 mit der entsprechenden Dunkelfärbung. Im Falle, daß die Farbintensität einer der linken Felder 5, bspw. das mit der Bezeichnung "HSV", zwischen zwei Farbintensitäten benachbarter rechter Felder 6, bspw. zwischen denjenigen mit den Kontrollzeichen D und E, liegt, entspricht auch die Konzentration der im Patientenserum enthaltenen Antikörper des Herpes-Simplex-Virus (HSV Virus) einem Wert zwischen den beiden Konzentrationen der entsprechenden Felder 6 D und E.

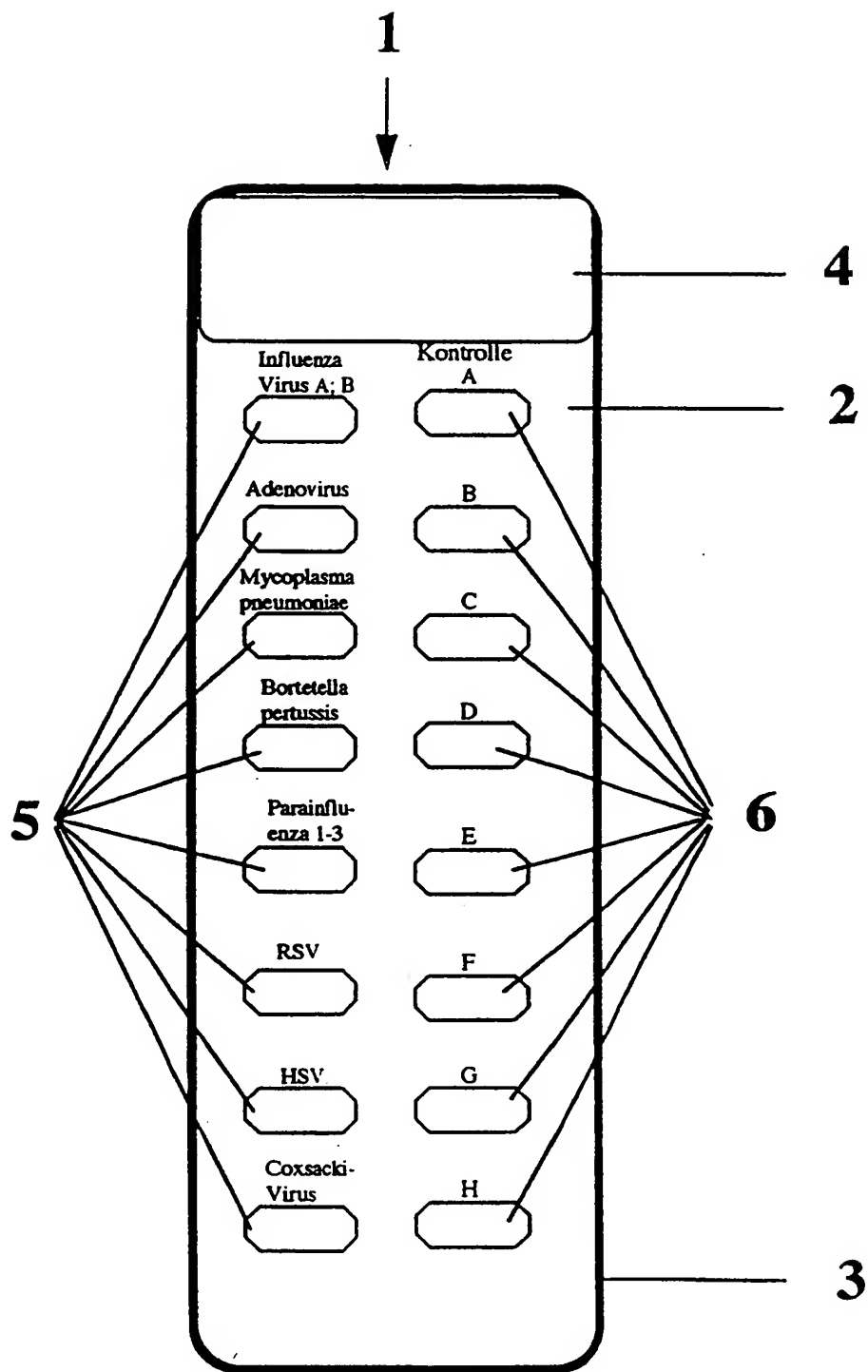
Fig. 2 zeigt einen sehr schmalen Meßstreifen 1a mit einem Kennzeichnungsfeld 4a sowie mehreren untereinander angeordneten Antigenfeldern 5 und Antikörperfeldern 6, die hier besonders klein ausgebildet sind, im Beispiel 5 x 3 mm, wodurch nur eine sehr geringe Menge an Patientenserum für einen Test benötigt wird. Jeweils oberhalb der Antigenfelder 5 sind die Namen des zu untersuchenden Krankheitserreger und oberhalb der Antikörperfelder 6 jeweils ein Kontrollzeichen, bspw. die Buchstaben A bis D für die unterschiedlichen Konzentrationen und ein "-" für ein Feld für den Gegencheck (keine Antikörper) abgedruckt.

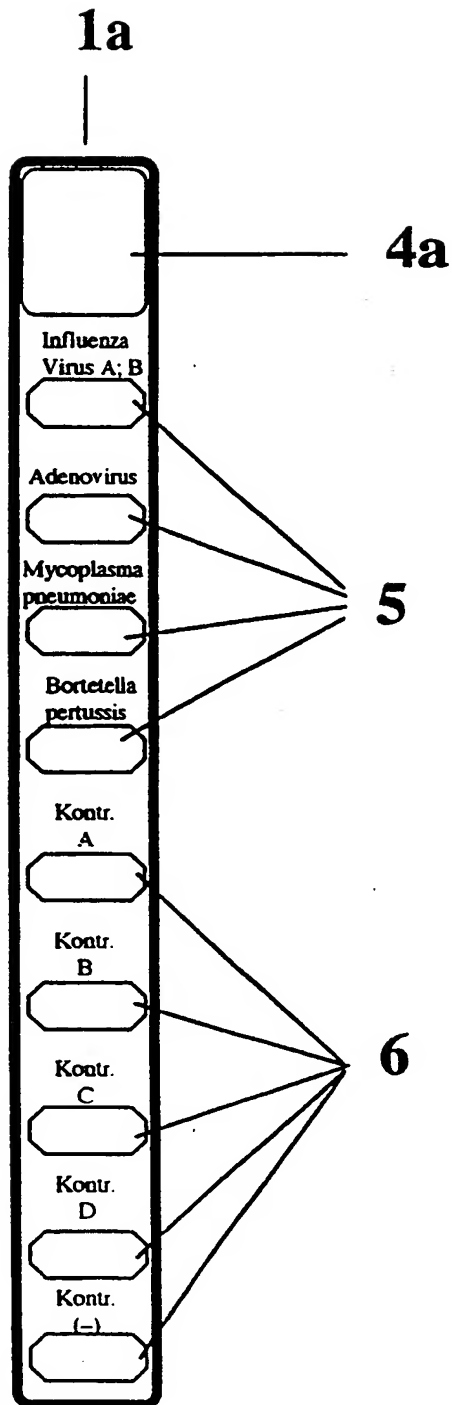
## Patentansprüche

1. Indikationsstreifen (1) zum Nachweis von Antikörpern im Blutserum von Patienten mit einem oder mehreren Feldern (5), in denen Antigene für eine oder mehrere Krankheiten fixiert sind, wobei das entsprechende Antigen beim Hinzufügen von Patientenserum die der Krankheit entsprechenden Antikörper festhält und diese Antikörper durch eine nachfolgende Reaktion als Farbfleck sichtbar gemacht werden, gekennzeichnet durch weitere Felder (6), in denen humane Referenz-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen fixiert sind.
2. Indikationsstreifen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zum Fixieren der Referenz-Antikörper wenigstens ein spezifisches Antigen auf eine Festphase (2) aufgebracht ist.
3. Indikationsstreifen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenz-Antikörper mit gleicher subtypisch spezifischer Klasse, wie bspw. IgG, IgA, IgM oder dgl., aufgetragen sind.
4. Indikationsstreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nachfolgende Reaktion mit einem Enzymkonjugat erfolgt.
5. Indikationsstreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß für die nachfolgende Reaktion als Substrat ein Enzymsubstrat, vorzugsweise auf Tetramethylbenzidin-Basis, für eine Niederschlagsfärbung verwendet wird.
6. Indikationsstreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß für die nachfolgende Reaktion fluoreszierende oder radioaktiv markierende Substanzen zum

Einsatz kommen, wobei der "Farbfleck" im letzteren Fall im nichtoptischen Spektrum liegt.

1 / 2

**Fig. 1**

**Fig. 2**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02808

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	EP 0 063 810 A (CIBA GEIGY AG) 3 November 1982 (1982-11-03) abstract page 8, line 4 - line 20 page 14, line 5 - line 24 page 20, line 4 - line 10 page 21, paragraph 2; example 6 ---	1-4, 6 5
X	EP 0 253 464 A (HYBRITECH INC) 20 January 1988 (1988-01-20) page 2, line 25 page 3, line 24 - line 45; claims 27, 28 ---	1, 2, 4-6
X	EP 0 171 150 A (ORGENICS LTD) 12 February 1986 (1986-02-12) figure 1; example 5 ---	1-4, 6
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 1999

Date of mailing of the international search report

30/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02808

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 92 08809 A (UNIV FLORIDA)  29 May 1992 (1992-05-29)  page 8, line 34 - page 10, line 37;  figures 2,3; example 6  -----</p>	1-4,6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0063810      A	03-11-1982	AR 231590 A	28-12-1984
		AT 18463 T	15-03-1986
		AU 560790 B	16-04-1987
		AU 8306982 A	04-11-1982
		BR 8202492 A	12-04-1983
		CA 1200761 A	18-02-1986
		CY 1437 A	10-03-1989
		DK 189182 A,B,	30-10-1982
		FI 821441 A,B,	30-10-1982
		GB 2099578 A,B	08-12-1982
		GR 75430 A	17-07-1984
		HK 53888 A	22-07-1988
		IE 53295 B	12-10-1988
		JP 58009070 A	19-01-1983
		PH 26773 A	28-09-1992
		PT 74816 A,B	01-05-1982
		US 5486452 A	23-01-1996
		ZA 8202896 A	29-12-1982
EP 0253464      A	20-01-1988	AT 76689 T	15-06-1992
		AU 7044787 A	24-09-1987
		AU 658566 B	27-04-1995
		AU 7727491 A	26-09-1991
		CA 1286987 A	30-07-1991
		DE 3779365 A	02-07-1992
		ES 2042550 T	16-12-1993
		GR 3005303 T	24-05-1993
EP 0171150      A	12-02-1986	JP 62231168 A	09-10-1987
		AT 74210 T	15-04-1992
		DE 3585709 A	30-04-1992
WO 9208809      A	29-05-1992	JP 61082166 A	25-04-1986
		AU 9052491 A	11-06-1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02808

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	EP 0 063 810 A (CIBA GEIGY AG) 3. November 1982 (1982-11-03) Zusammenfassung Seite 8, Zeile 4 - Zeile 20 Seite 14, Zeile 5 - Zeile 24 Seite 20, Zeile 4 - Zeile 10 Seite 21, Absatz 2; Beispiel 6 ----	1-4,6  5
X	EP 0 253 464 A (HYBRITECH INC) 20. Januar 1988 (1988-01-20) Seite 2, Zeile 25 Seite 3, Zeile 24 - Zeile 45; Ansprüche 27,28 ----	1,2,4-6
X	EP 0 171 150 A (ORGENICS LTD) 12. Februar 1986 (1986-02-12) Abbildung 1; Beispiel 5 ----	1-4,6
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. August 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/08/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02808

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 08809 A (UNIV FLORIDA) 29. Mai 1992 (1992-05-29) Seite 8, Zeile 34 - Seite 10, Zeile 37; Abbildungen 2,3; Beispiel 6 -----	1-4,6

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02808

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0063810 A	03-11-1982	AR 231590 A	28-12-1984
		AT 18463 T	15-03-1986
		AU 560790 B	16-04-1987
		AU 8306982 A	04-11-1982
		BR 8202492 A	12-04-1983
		CA 1200761 A	18-02-1986
		CY 1437 A	10-03-1989
		DK 189182 A, B,	30-10-1982
		FI 821441 A, B,	30-10-1982
		GB 2099578 A, B	08-12-1982
		GR 75430 A	17-07-1984
		HK 53888 A	22-07-1988
		IE 53295 B	12-10-1988
		JP 58009070 A	19-01-1983
		PH 26773 A	28-09-1992
		PT 74816 A, B	01-05-1982
		US 5486452 A	23-01-1996
		ZA 8202896 A	29-12-1982
EP 0253464 A	20-01-1988	AT 76689 T	15-06-1992
		AU 7044787 A	24-09-1987
		AU 658566 B	27-04-1995
		AU 7727491 A	26-09-1991
		CA 1286987 A	30-07-1991
		DE 3779365 A	02-07-1992
		ES 2042550 T	16-12-1993
		GR 3005303 T	24-05-1993
EP 0171150 A	12-02-1986	JP 62231168 A	09-10-1987
		AT 74210 T	15-04-1992
		DE 3585709 A	30-04-1992
WO 9208809 A	29-05-1992	JP 61082166 A	25-04-1986
		AU 9052491 A	11-06-1992

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**